

## 5. Zusammenfassung

Die beiden Nukleotide  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  sind essentielle Coenzyme für zahlreiche Redoxreaktionen in allen bekannten Organismen. Sie sind außerdem Vorstufen für Signalmoleküle und Substrate für kovalente Proteinmodifikationen in höheren Eukaryoten. Bislang lagen zu den essentiellen Enzymen der  $\text{NAD(P)}^+$ -Synthese, der NMNAT und der  $\text{NAD}^+$ -Kinase, keine Sequenzdaten vor. Aus diesem Grund waren molekular- und zellbiologische Untersuchungen der  $\text{NAD(P)}^+$ -Synthese und deren Regulation bisher nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Voraussetzungen für solche Untersuchungen geschaffen und erstmals proteinchemische und zellbiologische Studien dieser Proteine durchgeführt. Die cDNA-Sequenz der humanen  $\text{NAD}^+$ -Kinase wurde identifiziert. Das Protein wurde in *E. coli* überexprimiert und gereinigt. Es wurden Antikörper generiert, mit deren Hilfe endogene  $\text{NAD}^+$ -Kinase in humanen Zellen nachgewiesen wurde. Darüber hinaus wurde das Enzym im Cytosol von transfizierten humanen Zellen lokalisiert. Humane  $\text{NAD}^+$ -Kinase hat eine molekulare Masse von etwa 50 kDa. Sie bildet ein katalytisch aktives Homotetramer, wie durch Gelfiltrationsexperimente gezeigt werden konnte. Das Enzym weist eine hohe Substratspezifität auf, eine Phosphorylierung verschiedener  $\text{NAD}^+$ -Analoga, darunter  $\text{NAAD}^+$ , konnte nicht beobachtet werden. Die hier klonierte  $\text{NAD}^+$ -Kinase kommt daher wahrscheinlich nicht, wie eingangs vermutet, für eine Synthese des Calcium-Mediators  $\text{NAADP}^+$  in Frage.

Die mRNA der  $\text{NAD}^+$ -Kinase konnte in zahlreichen humanen Geweben mit Ausnahme von Muskelzellen nachgewiesen werden. Durch einen Vergleich der cDNA-Sequenz mit genomischen Sequenzen und durch eine Southern Blot-Analyse konnte das Gen der  $\text{NAD}^+$ -Kinase auf Chromosom 1 lokalisiert werden. Die Proteinsequenz der humanen  $\text{NAD}^+$ -Kinase wurde mit den inzwischen klonierten  $\text{NAD}^+$ -Kinasen aus *M. tuberculosis*, *E. coli* und *S. cerevisiae* verglichen, wobei 38 konservierte Reste identifiziert wurden. Diese liegen innerhalb einer konservierten Proteindomäne, die in etwa 100 bislang uncharakterisierten Proteinen zahlreicher Organismen, darunter auch in einem weiteren humanen Protein, vorkommt. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine zweite humane  $\text{NAD}^+$ -Kinase.

Die humane NMNAT wurde ebenfalls in *E. coli* überexprimiert. Gegen das gereinigte rekombinante Protein wurden Antikörper generiert, die eine Lokalisierung des endogenen Proteins in den Kernen humaner Zellen erlaubten. Es konnte eine Phosphorylierung der NMNAT *in vitro* und *in vivo* detektiert werden. Eine Phosphorylierungsstelle wurde durch massenspektrometrische Analyse identifiziert und konnte durch Mutagenese-Studien bestätigt werden. Es handelt sich um das Serin 136, das sich in unmittelbarer Nähe der NLS in einem strukturell exponierten Bereich der NMNAT befindet. Das Serin 136 liegt innerhalb einer Konsensussequenz welche die Modifikation durch Proteinkinase C nahelegt. Der Einfluß von Effektoren der Proteinkinase C, PMA und BIM, auf die Phosphorylierung der NMNAT *in vitro* und *in vivo* weisen ebenfalls auf eine Phosphorylierung durch diese Kinase hin. Die Funktion dieser Modifikation ist nicht bekannt. Die katalytische Aktivität der NMNAT, die Kernlokalisation des Enzyms sowie seine Wechselwirkung mit PARP-1 blieben davon unbeeinflusst.

Zusammengefaßt stellen diese Ergebnisse für das Verständnis der  $\text{NAD(P)}^+$ -Synthese und der daran gekoppelten zellulären Energie- und Signalprozesse einen großen Fortschritt dar. Erstmals sind Schlüsselenzyme der  $\text{NAD(P)}^+$ -Synthese eukaryotischer Zellen für Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* zugänglich geworden.